

VELEUČILIŠTE U RIJECI

Petra Šunduković

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SMILJA
(*Helichrysum italicum* / Roth / G. Don)
S RAZLIČITIH LOKACIJA
(završni rad)

Rijeka, 2018.

VELEUČILIŠTE U RIJECI

Poljoprivredni odjel
Stručni studij Mediteranska poljoprivreda

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI SMILJA (*Helichrysum italicum* / Roth / G. Don) S RAZLIČITIH LOKACIJA (završni rad)

MENTOR

Dr.sc. Siniša Petrović prof.v.š.

STUDENT

Petra Šunduković

MBS: 2421009842/13

Rijeka, kolovoz, 2018.

VELEUČILIŠTE U RIJECI

Prilog 1.

Poljoprivredni odjel

Poreč, 05.02.2018.

ZADATAK za završni rad

Pristupnici: Petri Šunduković

MBS: 2421009842/13

Studentu stručnog studija Mediteranske poljoprivrede izdaje se zadatak završni rad
– tema završnog rada pod nazivom:

Određivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakta smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) s različitih lokacija.

Sadržaj zadatka: Provesti ekstrakciju cvijeta i lista smilja (*Helichrysum italicum* (Roth) G. Don) sakupljenog u prirodi na različitim lokacijama korištenjem etanola i acetona kao otapala. Određivanje antioksidacijske aktivnosti pripremljenih ekstrakata provesti će se korištenjem stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH) spektrofotometrijskom metodom. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata usporediti će se s aktivnosti standardnog antioksidansa vitamina C.

Preporuka: Pripremu ekstrakta cvijeta i lista smilja te mjerenje antioksidacijske aktivnosti obaviti u laboratoriju Poljoprivrednog odjela Veleučilišta u Rijeci.

Rad obraditi sukladno odredbama Pravilnika o završnom radu Veleučilišta u Rijeci.

Zadano: 05.02.2018.

Predati do: 15.09.2018.

Mentor:

(Ime i prezime)

Pročelnik odjela:

(Ime i prezime)

Zadatak primio dana: 05.02.2018.

(Petra Šunduković)

Dostavlja se:

- mentoru
- pristupniku

IZJAVA

Izjavljujem da sam završni rad pod naslovom *Određivanje antioksidacijske aktivnosti smilja (Helichrysum italicum / Roth / G. Don) s različitih lokacija* izradila samostalno pod nadzorom i uz stručnu pomoć mentora *dr. sc. Siniše Petrovića prof.v.š.*

Ime i prezime

Petra Šundaković
(potpis studenta)

SAŽETAK

Helichrysum italicum jedna je od onih biljaka čija su iscjeljujuća svojstva jedno vrijeme pala u zaborav, a potom su nanovo otkrivena. Cvijet smilja nazivaju besmrtnim, vječnim, spremnikom moćnog eterčnog ulja koji briše sve tragove vremena na licu. *H. italicum* koji je analiziran, ubiran je na više različitih lokacija: Pelješac, Istra, Brač, Cres. Provedeno je istraživanje antioksidacijske aktivnosti pomoću testa redukcije stabilnog slobodnog radikala DPPH. Napravljeni su alkoholni i acetonski ekstrakti za koje su se koristili 30% etanol i 30% aceton u trajanju od 30 min na 60 °C. Najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je alkoholni ekstrakt lista sa Cresa. Najbolji acetonski ekstrakt je bio ekstrakt cvijeta sa Pelješca. Alkoholni i acetonski ekstrakti najviše se razlikuju u 2 uzroka a to su Pelješac-cvijet i Cres-list, dok kod drugih uzoraka nije bilo značajnih odstupanja. Ekstrakti dobiveni korištenjem ova dva otapala pokazali su antioksidacijsku aktivnost koja je ekvivalentna antioksidacijskom djelovanju vitamina C u rasponu od 6.7 do 1.8 mmol/L.

Ključne riječi: Smilje (*Helichrysum italicum*), antioksidacijska aktivnost, DPPH, ekstrakcija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Pregled literature	4
1.1.1. Botanička obilježja smilja	4
1.1.2. Uzgoj smilja i upotreba	5
1.1.2.1. Tlo i klima	5
1.1.2.2. Sadnja	6
1.1.2.3. Proizvodnja presadnica	6
1.1.2.4. Berba i prinos smilja	7
1.1.2.5. Priprema tla i gnojidba	8
1.1.2.6. Bolesti i štetnici	10
1.1.2.7. Upotreba smilja	10
1.1.3. Kemijski sastav i ljekovitost smilja	11
1.1.4. Fenolni spojevi	13
1.1.4.1. Flavonoidi	14
1.1.4.2. Neflavanoidi	15
1.1.5. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva	17
1.1.6. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	18
1.1.7. Cilj istraživanja	19
2. RAZRADA TEME	20
2.1. Materijali i metode	20
2.1.1. Materijali	20
2.1.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva	20
2.1.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	21
2.1.4. Statistička obrada podataka	23
2.2. Rezultati i rasprava	23
3. ZAKLJUČAK	28
POPIS LITERATURE	29
POPIS SLIKA	31
POPIS TABLICA	32

1. UVOD

Korištenje ljekovitih, aromatičnih i medonosnih biljnih vrsta od prapovijesti do danas izrazito je bilo i biti će važno za razvoj civilizacije. Korišteno je kao hrana i lijek za čovjeka i životinju, a smilje je jedna od njih. Sredozemno ili primorsko smilje (*Helichrysum italicum* /Roth/G. Don) je patuljasti aromatičan grm, svijetlo zelenih listova i zlatno žutih cvjetnih glavica. Raste samoniklo na sunčanim kamenjarima (slika 1.) te suhom i pjeskovitom tlu. Smilje je tipična mediteranska biljka koja pripada porodici Asteraceae (glavočike), a obuhvaća preko 600 različitih vrsta rasprostranjenih diljem svijeta. Primorsko smilje je prirodno rasprostranjeno u zemljama Sredozemlja: Cipar, Grčka, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Albanija, Italija, Francuska, Španjolska, Alžir i Maroko. Najpoznatije prirodno nalazište je na Korziki. (Pohajda i sur.,2015.)

Slika 1. Samoniklo primorsko smilje (*H. italicum*) na stijenama



Izvor: Šunduković, 5.6.2018, Pula

U Hrvatskoj su najznačajnije vrste *H. italicum* (primorsko smilje) i *H. arenarium* (pješčano smilje) (Slika 2.). Vrsta *H. arenarium* u mediteranskom dijelu Hrvatske najčešće se koristi kao ukrasna vrsta, dok za uvođenje u poljoprivrednu proizvodnju *H. italicum* je od posebnog značaja. Aromatična svojstva određuju primjenu smilja, kao i drugih vrsta ljekovitog i aromatičnog bilja u farmakološke svrhe, kozmetičkoj industriji i kulinarstvu. *H. italicum* ima primjenu u svim navedenim segmentima, a vrsta *H. arenarium* najčešće se primjenjuje u farmakološke svrhe (Pohajda i sur., 2015). Imortelle, magri marjetica i curry plant sinonimi su za ovu samoniklu mediteransku biljku (Mucalo, 2015). Etimologija imena roda *Helichrysum* dolazi od grčke riječi *Helios* (sunce) i *chrysos* (zlato) koje asociraju na boju cvjetova, dok ime vrste *italicum* dolazi kao izvedenica od imena države Italije gdje je ova biljna vrsta po prvi put opisana. (Mucalo, 2015).

Slika 2. Primorsko smilje (*H. italicum*) i Pješčano smilje (*H. arenarium*)



Primorsko smilje *Helichrysum italicum* Pješčano smilje *Helichrysum arenarium*
(Foto: Matthias Zimmermann (GFDL), Wikimedia Commons)

Izvor: <http://www.gospodarski.hr>, (15.6.2018)

Spominje se u djelima antičkih, grčkih i rimskih pisaca kao snažan eliksir koji djeluje regenerativno na oštećenu kožu. Smilje i danas ima jednako važnu ulogu u tradicionalnoj medicini mediteranskih zemalja. Najviše se koriste cvjetovi i listovi, a primjenjuju se kod zdravstvenih poremećaja poput alergija, prehlada, kašlja, kožni, jetrenih i žučnih oboljenja. Uz *H. italicum* korištene su i neke druge vrste u svrhu liječenja. *H. arenarium* koristio se u srednjoj Europi zbog svojih antiseptičkih, koleretičkih i spazmolitičkih svojstava (FSI Grupa, 2016), *H. Graveolens* tradicionalno se koristio u kontroli simptoma šećerne bolesti, kod zacjeljivanja rana i kao diuretik. U Španjolskoj narodnoj medicini *H. stoechas* se koristio zbog svojih protuupalnih i zacjeljujućih svojstava, kao i kod zubobolje, uroloških poteškoća te poremećaja probavnog sustava. U ranim opisima ljekovitih svojstava biljaka iz tog roda, *Helichrysum* se obrađivao kao cjelina bez jasne naznake o specifičnim vrstama na koje se podatak odnosi. Činjenica da se *Helichrysum* smatra vrlo složenim rodом, s velikim sličnostima između pojedinih vrsta može opravdati povijesne i današnje teškoće u točnoj identifikaciji biljaka.

1.1. PREGLED LITERATURE

1.1.1. Botanička obilježja smilja

Sredozemno smilje je aromatičan polugrm 20 do 60 cm visine, pri bazi drvenast i razgranjen. Grane su uglate, šire, polegale ili uzdižuće, dok su mlade prekrivene dlakama. Listovi su svijetlo zeleni, sjedeći, linealni više ili manje pustenasti (često i sasvim goli), dugi 1-3 cm i na rubu uvijeni, prekriveni malim, blistavim bijelim žilicama(slika 3). Imaju blagi okus curryja. Deblja kutikula listova i guste dlačice na naličju, koje štite puči s ciljem smanjenja transpiracije, osiguravaju biljci prilagođenost na sušne uvjete staništa, čime se uvrštava u skupinu kserofitnog bilja (Beljo i sur.,2016).

slika 3. List smilja (*H. italicum*)



Izvor: Šunduković 10.6.2018. Rovinj

Valjkaste, zlatnožute cvjetne glavice promjera su 2-4 mm i duže su nego šire. Svi cvjetovi u cvatu su cjevasti, a sam cvat okružen je pricvjetnim listovima. Muški cvjetovi su neugledni, cjevastog oblika. Unutrašnji su pricvjetni listovi cvata 5-8 puta duži od vanjskih, ovalnih, i papirastih, koji nose malene crvenkaste žlijezde. Više cvjetnih glavica skupljeno je u složen štitasti cvat, promjera do 8 cm, koji se nalazi na vrhovima grana. Biljka je dvodomna, te raste od travnja do srpnja. Nakon oplodnje cvjetovi brzo sazrijevaju. Plodovi su roške(achenium)prožete bijelim i sjajnim žilicama. Sjeme je vrlo sitno, izduženo, gotovo crne boje, a 1 g sjemena sadrži 3300- 3700 zrna (slika 4). Podzemni izdanak smilja je razgranat, duboko prodire u tlo. Iz drvenastog vretenastog rizoma svake sezone se razvija više desetaka stabljika koje nose cvijet.

Brži protok vode osiguran je širim provodnim nitima u morfologiji ksilema, čime su biljke prilagođene na sušu.

Slika 4. Sjeme smilja



Izvor: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images.html?>, (15.6.2018)

1.1.2. Uzgoj i upotreba smilja

1.1.2.1. Tlo i klima

Za uzgoj smilja nije potrebno puno truda jer smilje podnosi visoke ljetne temperature i krš, a može podnijeti i oštrije zime zbog čega se prirodno nalazi na višim nadmorskim visinama do 2000 m. Zbog svoje otpornosti na visoke i niske temperature i prilagodbu na krški teren također nema velike zahtjeve za vodom. Prirodno raste na oskudnim i siromašnim terenima. Dobro podnosi sušu i minimalnu količinu hranjiva, a može uspjeti i na plodnim dubokim tlima, bogatim karbonatima. Teška, vlažna i kisela tla treba izbjegavati jer u njima propada korijen. Budući da smilje prirodno raste na kamenjaru, moguće ga je uzgojiti no zato je potrebna mehanizirana obrada tla. Tlo se usitnjava uz pomoć drobilice koja stijenu pretvara u šljunak te se na taj način stvara supstrat pogodan za obradu i održavanje nasada. Smilje je trajnica koja traje 5-8 godina na istom tlu. Predkulture koje su pogodne za nasad smilja su one koje ostavljaju za sobom čisto tlo od korova, a to su strne žitarice, leguminoze i okopavine.

1.1.2.2. Sadnja

Kod svake sadnje potrebno je znati kvalitetu sadnog materijala i sjemena. Sadnice moraju biti uzgojene od certificiranog sjemena kako bi se znalo koja sorta je u pitanju. Sadnja presadnica se obavlja u proljeće u ožujku ili na jesen tijekom listopada, te ju je najjednostavnije obaviti strojno uz pomoć motokultivatora. Za sadnju presadnica sađenih u redove na razmake 0,7 m x 0,4 m potrebno je osigurati 35.000 biljaka / ha, dok je za razmake 0,6 m x 0,3 m potrebno je osigurati 55.000 biljaka / ha. Kod sijanja, najbolje je sijati u kontejnere od stiropora. Kontejneri se napune tankim slojem humusa 5-7 cm te se dobro natope vodom. 1 g sjemena se podijeli na 10 jednakih dijelova te se miješa sa sitnom piljevinom kako bi se stvorio pogodan supstrat za daljnje razvijanje sjemena. Poslije sijanja smilje se ne zalijeva. Prva 3 do 4 dana kontejneri se čuvaju na suhom i hladnom mjestu dok sjeme ne proklija, zatim se prebacuju na osunčano mjesto.

1.1.2.3. Proizvodnja presadnica

Smilje se razmnožava generativno sjemenom i vegetativno reznicama ili dijeljenjem busena. Izravna sjetva iz sjemena se ne preporuča ako podižemo nasad, u tom slučaju je važno proizvesti kvalitetne presadnice. Proizvodnja presadnica iz sjemena (slika 5.) uključuje njihov uzgoj tijekom ljeta u hladnim klijalštima. Kod ručne sjetve sjemena na 1m² hladnog klijalšta potrebno je oko 0,5 g sjemena, čija je klijavost 50 %. Sa hladnog klijalšta površine 1m² može se dobiti 300 – 400 presadnica smilja.

Slika 5. Klijanči smilja



Izvor: <https://www.google.hr/search?q=kultiviranje+smilja>, (6.6.2018)

Prva faza je ravnomjerno punjenje kontejnera smjesom organskog supstrata na automatiziranoj liniji za pneumatsku sjetvu sjemena. Prije sjetve supstrat se mora dobro rastresti, zatim se puni u sjetvena mjesta pazeći da bude ravnomjerno napunjeno, bez šupljina ili prevelike zbijenosti. U

kontejner napunjen supstratom sije se po jedno pilirano sjeme. Nakon sjetve posijani supstrat odmah mora dobiti vlagu te se odlaže u tamnu komoru za naklijavanje. Temperatura naklijavanja u komori iznosi 26 °C uz vlažnost zraka 100%. Proces naklijavanja traje četiri (4) dana te nakon toga isključivo biljčice izlaze iz komore i prenose se u ugrijani staklenik na daljnje održavanje. Optimalne temperature za rast i razvoj presadnica smilja u stakleniku su 22-24 °C dnevne i 8°C noćne (Beljo i sur., 2016). Presadnice proizvedene iz sjemena nakon 90 dana spremne su za sadnju na poljoprivrednim površinama. Proizvodnja presadnica vegetativnim razmnožavanjem iz reznica (Slika 6.) može se odvijati u zaštićenom prostoru tijekom 4-5 tjedana . Kvalitetne presadnice prije presađivanja moraju biti optimalne visine (7-9 cm) sa dobro razvijenim listićima lijepe sivo- zelene boje i dobro razvijenim korijenovim sustavom.

Slika 6. Proizvodnja presadnica vegetativnim razmnožavanjem.



Izvor: <https://www.google.hr/search?q=sadnice+smilja&source>, (6.6.2018)

Na gornjem dijelu reznica potrebno je ostaviti 4-5 listića kako bi biljci omogućili proces fotosinteze, te je ostale listiće potrebno ukloniti kako bi se osiguralo dovoljno energije za stvaranje korijena. Nakon što se napravi kosi rez, reznice se stavljaju u pripremljeni supstrat. Za brži rezultat poželjna je i primjena hormona za ukorjenjivanje. Reznicama je potrebno osigurati dovoljno vlage i svjetlosti uz zaštitu od prejakog utjecaja sunčeve zračenja.

1.1.2.4. Berba i prinos smilja

Na mladim nasadima se ne može očekivati prinos koji se očekuje između treće i osme godine. U prvoj sezoni uzgoja bitno je orezivanjem ojačati bazne dijelove grmova čime će se potaknuti bujnost i kvaliteta nasada u sljedećim sezonama a time i povećati prinos. Berba smilja za proizvodnju eteričnog ulja odvija se u punoj tehnološkoj zrelosti između 15.6-15.8, kada je najveći broj biljaka u cvatu, odsjecanjem cvati iznad prvih listova na dužinu 15- 20 cm. Druga

berba se provodi 1.10-15.12. Berba za proizvodnju suhog cvijeta izvodi se kada je 1/3 cvjetova u cvatu otvorena, te cvjetovi imaju zlatno-žutu boju. Kod košnje treba biti pažljiv jer pogrešna košnja do odrvenjelih baznih dijelova grma spriječiti će daljnji rast biljke. Prinosi variraju ovisno o starosti nasada i ekološkim uvjetima mikrolokaliteta. Tako prinosi svježeg cvijeta u punoj zrelosti nasada variraju od 7 do 8 t/ha, od kojih će se dobiti u pola manje suhe mase, odnosno 3,5 do 4 t/ha suhog cvijeta. Postupak sušenja smilja kojim se cvijet konzervira dehidracijom, može se obavljati prirodnim putem ili u sušarama. Prirodnim putem sušenja se dobivaju manje količine eteričnog ulja. U prostorima za prirodno sušenje potrebno je osigurati kvalitetnu cirkulaciju zraka, te u tankom sloju rasporediti smilje i ne ostavljati ga direktno na sunčevu svjetlost. Postupak sušenja u sušarama je svakako brži proces u odnosu na prirodan način, te se smilje suši na 35 do 40 °C (FSI grupa, 2016)

Slika 7. Ručna berba smilja



Izvor: [https://www.google.hr/searchkultiviranje+smilja&source\(15.5.2018\)](https://www.google.hr/searchkultiviranje+smilja&source(15.5.2018))

1.1.2.5. Priprema tla i gnojidba

Priprema tla uključuje oranje krajem ljeta ili početkom jeseni i kultivaciju tla nakon oranja na jesen ili u proljeće ovisno o tome hoće li se sadnja obaviti u jesen ili proljeće a to najviše ovisi o mjestu di se sadi odnosno o temperaturama tog lokaliteta. Neobrađivo poljoprivredno zemljište u agrotehničkom smislu ima nekoliko nedostataka koji se u pripremi terena za proizvodnju moraju otkloniti.

Proces uređenja zemljišta na krškim terenima kompleksan je zahvat iz nekoliko razloga:

1. velika kamenitost terena (preko 50%)
2. obraslost makijom ili slabo razvijenom šumom
3. nagib
4. opasnost od erozije
5. nepostojanje pristupnih putova (Beljo i sur., 2016)

Kultiviranje nasada uključuje unutarrednu obradu strojevima za rahljenje, usitnjavanje i miješanje tla kako bi se popravilo stanje tla, ubrzala topivost hranjiva i uklonili korovi. Obavlja se motokultivatorom i traktorima različite snage sa šizel plugovima kao priključnim oruđima. Prije žetve potrebno je izvršiti 4-6 kultiviranja. Nakon svakog strojnog kultiviranja smilja, potrebno je unutarredno okopavanje. Za okopavanje smilja (u redu) potrebno je 10 radnih dana po 1 ha.

Slika 8. Kultivirani nasada smilja



Izvor: <https://www.google.hr/search?q=kultiviranje+smilja&source>, (10.6.2018)

Gnojidba je važan pothvat kod podizanja trajnih nasada. Potrebno je napraviti kemijsku analizu tla, pa prema tome odrediti količinu i vrstu gnojiva. Osnovna gnojidba prilikom oranja u skladu s rezultatima analize tla može uključiti 200 do 400 kg/ ha mineralnog NPK gnojiva (15-15-15). Kod ekološkog uzgoja korištenje mineralnih gnojiva se isključuje te se smiju koristiti samo gnojiva koja imaju dozvolu korištenja u ekološkoj proizvodnji. Također nije poželjno korištenje stajskog gnoja zbog pojave korova. Kultura smilja se može gnojiti i folijarnim organskim gnojivima u razmacima od 7-10 dana u vegetaciji. Ukoliko se gnoji peletiranim gnojivima u ekološkoj proizvodnji može se dodati u osnovnu gnojidbu 1000 do 1500 kg peleta po 1 ha. Peletiranim organskim gnojivima izbjegavamo značajniju pojavu korova.

1.1.2.6. Bolesti i štetnici

Smilje posjeduje insekticidno i repelentno djelovanje, no male biljke koje nisu još akumulirale dovoljnu količinu eteričnog ulja često napadaju razni štetnici kao što su lisne i štitaste uši, štitasti moljac, kalifornijski trips, lisni mineri i gusjenice moljaca. Ekološki pripravci na bazi pelina, koprive i luka zaštititi će biljke od lisnih ušiju. Pripravak na bazi ljute paprike i papra efektivan je kod kalifornijskog tripsa i lisnih minera. Gusjenice moljaca *Bucculatrix helichrysellae* i *Coleophora helichrysellae* pričinjavaju značajne štete u nasadima nekih europskih zemalja, u Hrvatskoj nisu potvrđeni njihova prisutnost i šteta. U borbi protiv gljivičnih bolesti poput sive plijesni (*Botrytis* sp.) zaražene listove i stabljike potrebno je uklanjati te kurativno koristiti pripravke na bazi luka ili preslice. (Dudaš, 2017.)

1.1.2.7. Upotreba smilja

U posljednjih nekoliko desetljeća vrste iz roda *Helichrysum* predmet su mnogih istraživanja, a glavni motiv za to je njihova tradicionalna terapijska primjena. *H. italicum* se upotrebljavao kod upala, alergijskih reakcija povezanih s dišnim putovima i kod kožnih bolesti (FSI grupa, 2016). Eterično ulje *H. italicum* pomaže kod zacjeljivanja rana i drugih kožnih stanja (hematoma ili ožiljaka). Schnaublet (1999) istaknuo je kako je zanimljiva njegova terapijska primjena te izjavio: „njegovi učinci su toliko uvjerljivi da se nikada nije susreo s bilo kakvom kritikom, bez obzira na nedostatak podataka o njegovoj učinkovitosti”. Čaj pripremljen od cvjetova *H. italicum* koristio se u liječenju želučanih, crijevnih i probavnih tegoba (FSI Grupa, 2016). Cvjetovi žutog smilja kuhani u vinu upotrebljavali su se kod tegoba s prsima, jetrom, slezenom, bubrezima i mjehurom. Biljka je služila i za suzbijanje glista, ušiju i kao zaštita od moljaca. Cvjetovi su se upotrebljavali za vanjsku primjenu kod gihta, reume i kožnih bolesti. (Schaffner, 1999). U našim krajevima, odnosno na otocima vjerovalo se da smilje u svojim zlatnim cvatovima akumulira sunčevu toplinu, zbog toga su žene punile paperjastim cvjetovima smilja jastuke i pokrivače kojima se grijalo kad bi zapuhala hladna bura. Na otoku Braču, da bi sačuvali svoje masline od štetočina težaci su bacali na grane svježeg smilja ili bi pod stablom palili suho granje kao zamjenu za sumpor. Posebno je zanimljiva upotreba smilja u proizvodnji eteričnog ulja. Antibakterijski učinak eteričnog ulja smilja i njegovih komponenti tema su mnogih znanstvenih istraživanja. Znanstvenici su dokazali da esterski ekstrakt *H. italicum* ima inhibirajući učinak na sojeve *Staphylococcus aureus*, smanjuje njihov rast i reducira neke od enzima koji se smatraju glavnim čimbenicima virulencije. (FSI grupa)

1.1.3. Kemijski sastav i ljekovitost smilja

Naime, zbog velikog broj spojeva analiza ulja poprilično je zahtjevna. Osim toga riječ je o spojevima slične strukture i sličnih fizikalno-kemijskih svojstava, što dodatno otežava njegovu identifikaciju. (Pohajda i sur., 2016).

Helichrysum italicum u sebi sadrži veliki broj spojeva, no mali postotak eteričnog ulja.

Znanstvena istraživanja su uglavnom usmjerena na analizu eteričnog ulja koje se kod smilja dobiva od svih zelenih dijelova (cvijeta i stabljike). Prema definiciji ISO (International Standards Organization) eterična ulja su uljasti proizvodi intenzivnog mirisa koji se dobivaju destilacijom vodenom parom iz cijelih biljaka ili dijelova biljaka (Dudaš, 2017). Komponente eteričnih ulja su hlapljivi, nepolarni i u vodi slabo topivi spojevi.

Eterično ulje u cvijetu smilja može sadržati od 0,05 do 1,3 % ulja te je detektirano 177 spojeva : monoterpenski, sesquiterpenski i neterpenski spojevi i njihovi ugljikovodici, alkoholi, esteri, karbonilni spojevi i oksidi.

Tablica. 1 Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju smilja

GLAVNI SPOJEVI	VRIJEDNOST (%)
α -pinen	8,76 – 27,23
neril- acetat	5,75 – 20,79
2-metilcikloheksil- pentanoat	7,81 – 15,76
α -cedren	5,35 – 13,62
Kariofilen	3,41 – 6,73
Limonen	3,01 – 6,18
Nerol	1,74 – 5,47

(izvor: Rajić i sur., 2015)

Metaboliti izolirani iz *H. Italicum*, posebice njihove hlapljive frakcije pokazuju mnoga biološka svojstva kao što su: antimikrobna, antiupalna i antivirusna djelovanja, posjeduju antioksidativnu aktivnost i insekticidnog su učinka.

Protuupalno djelovanje

Poznato je da *H. Italicum* sadrži ketone koji doprinose smanjenju procesa upale. Znanstvenici su kao glavnu komponentu izolirali arzanol. Rezultati dokazuju snažno inhibicijsko djelovanje arzanola prema upalnim enzimima i medijatorima, što je potvrda antiupalnog djelovanja *H. Italicuma*.

Antivirusna aktivnost

Smilje posjeduje snažno antivirusno djelovanje. Dietil eter ekstrakt, dobiven iz cvjetnih vrhova *H. Italicuma*, posjeduje značajnu aktivnost protiv Herpes simplex virusa tipa 1 (FSI Grupa d.o.o., 2016). Pojedini flavonoidni sastojci *H. italicuma* pokazuju antioksidativnu aktivnost koja je usko povezana s njegovim antiupalnim djelovanjima.

Insekticidno djelovanje

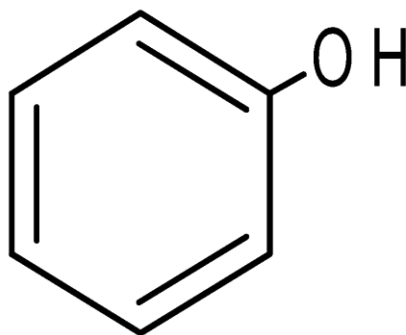
Nekoliko radova opisuje učinak *H. Italicum* u suzbijanju kukaca te jedan od njih pokazuje rezultate istraživanja da eterično ulje izolirano iz lišća *H. Italicum*, s otoka Elba, uzrokuje smrtnost komaraca *Aedes albopictus* pri koncentraciji od 300 ppm sa smrtnošću u rasponu od 98.30% do 100,00% (FSI Grupa d.o.o., 2016).

Iako je smilje pogodno za korištenje kod mnogih bolesti, najpopularnije je u upotrebi protiv bora, mrlja i drugih znakova starenja. Također je ustanovljeno da smilje ima nevjerovatan antioksidativni potencijal te snažna zaštitna svojstva najviše zbog neril-acetata. Zaštitna uloga smilja na koži: snažno djeluje protiv slobodnih radikala, značajno utječe na proizvodnju kolagena; potiče promjene u tkivu; poboljšava mikrocirkulaciju, a time i detoksikaciju kože, te djeluje antiseptički i pročišćavajuće.

1.1.4. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su spojevi u kojima je hidroksidna skupina povezana s benzenskim prstenom (Slika 9.) ta skupina naziva se fenolna skupina, iako veoma raznoliki po svom kemijskom sastavu, sadrže ju svi fenolni spojevi. Oni se ubrajaju u sekundarne metabolite, spojeve koji nemaju ulogu u primarnom metabolizmu, no unatoč tome njihova uloga je neobično važna za biljke jer sudjeluju u mehaničkoj potpori, obrani od herbivornih organizama i privlačenju oprašivača i rasprostranjivača plodova, redukcija rasta susjednih biljaka i dr (Brkljačić, 2015). U fenolne spojeve spadaju: fenolne kiseline, flavonoid, tanini i dr. Spojevi. Fenolni spojevi su karakteristični za biljke i kao skupina se više nalaze u obliku estera ili glikozida nego kao slobodan spoj što je vrlo važno ukoliko ih želimo izdvojiti iz biljnih tkiva.

Slika 9. Strukturna formula fenola



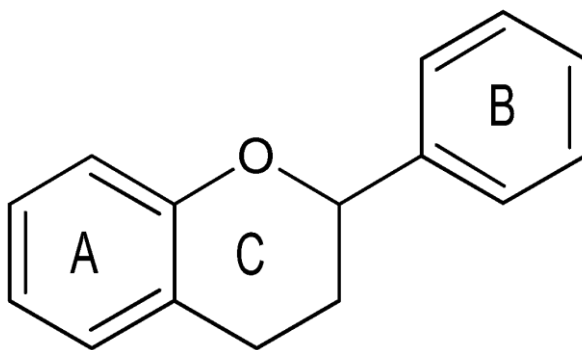
Izvor: Čović, 2016.

Posebno su značajni polifenoli kao sekundarni metaboliti biljaka i jedni od najvažnijih i najbrojnijih fitokemikalija u biljnom carstvu. Postoji više od 8000 identificiranih fenolnih spojeva u biljkama a velik broj njih pronađen je u namirnicama biljnog podrijetla (povrće, voće, čajevi, vino, maslinovo ulje, čokolada itd.). Predstavljaju veliku skupinu molekula s različitim funkcijama u rastu biljaka, razvoju i obrani. Fenolni spojevi uključuju signalne molekule, pigmente i okuse koji mogu privlačiti ili odbijati, kao i spojeve koji mogu zaštititi biljke od insekta, gljiva, bakterija i virusa. Neki polifenoli indirektno utječu na rast biljke te štite biljke od pojedinih UV zračenja. U hrani, polifenoli daju gorčinu, oporost, boju, okus, miris i oksidativnu stabilnost. Mogu se klasificirati na različite načine, a osnovna je podjela na temelju broja i rasporeda njihovih atoma ugljika (Vermerris i Nicholson, 2006). Znanstvenici su ih svrstali u dvije skupine: flavonoidi i neflavonoidi.

1.1.4.1. Flavonoidi

Flavonoidi ili bioflavonoidi (Slika 10.) su skupina raznolikih polifenola koji su široko rasprostranjeni u biljnim organizmima. Izolirano ih je preko 4000, a odgovorni su za šarenilo voća, povrća i cvijeća, te imaju ulogu u zaštiti biljaka od mikroba i napada insekata. Flavonoidi se mogu podijeliti u nekoliko većih skupina: antocijani, flavanoni, flavoni, falvonoli, izoflavonoidi, leukoantocijanidi, proantocijanidi (Vermerris i Nicholson, 2006). Zbog svoje strukture flavonoidi su snažni prirodni antioksidansi koji odstranjuju slobodne radikale koji uzrokuju oštećenje stanica, oštećenje nasljednog materijala (DNA), ubrzavaju proces starenja, te sudjeluju u razvoju mnogih bolesti.

Slika 10. Strukturna formula flavonoida



Izvor: Čović, 2016.

Antioksidativno djelovanje flavonoida se odnosi na sakupljanje i suzbijanje slobodnih radikala i singlet kisika, kao i inhibiciju enzima koji dovode do razvoja ovih reaktivnih molekula.

Flavonoidi se koriste kao lijekovi sa raznim učincima na žive organizme oni su prirodni lijekovi kod tretmana bolesti krvi, disanja, mokraćnog sustava i kože (Vermerris i Nicholson, 2006).

Antocijani su flavonoidni pigmenti koji cvjetovima, listovima i plodovima daju crveno, ružičasto i plavo obojenje sudjelujući tako u primamljivanju životinja koje oprašuju cvjetove i rasprostranjuju sjemenke. Na boju antocijana utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina na prstenu, prisutnost metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih pigmenata te pH vrijednost vakuole (Brkljačić, 2015).

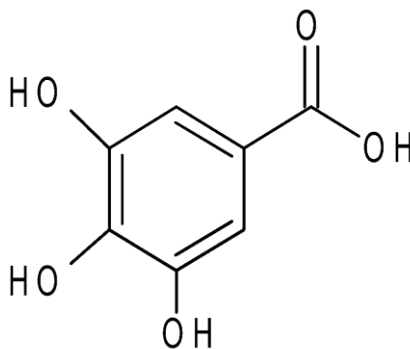
Tanini su široko rasprostranjeni fenolni polimeri u mnogim biljnim vrstama. Oporog su okusa te četo djeluju kao otrovi koji reduciraju rast i preživljavanje herbivora. Zajedničko svojstvo svih tania je da vežu proteine životinjske kože (kolagene), povećavaju otpornost na toplinu, vodu i mikrobe. U biljkama nalazimo kondenzirane tanine i tanine koji se mogu hidrolizirati (Brkljačić, 2015).

1.1.4.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi su također značajna i vrlo raznolika skupina fenolnih spojeva, a najvažniji predstavnici su fenolne kiseline, hidroksicimetne kiseline, stilbeni, lignin i dr.

Fenolne kiseline ($C_6 - C_1$) su vrlo rasprostranjene u biljnom svijetu a glavni predstavnik je galna kiselina (Slika 11.) i njeni derivati. Ona također sudjeluje i u izgradnji polifenolnih supstanci odnosno hidrolizirajućih tanina (Vermerris i Nicholson, 2006). Zbog gorkog okusa ove tvari izazivaju astringenciju kod životinja, što ometa biljojede i na taj način djeluje insekticidno i štiti biljku.

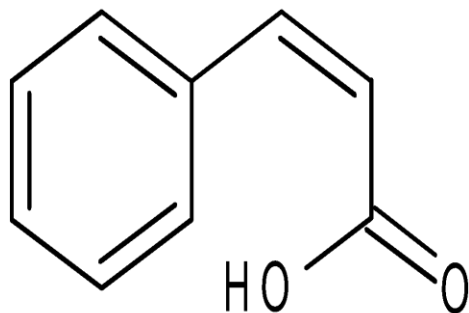
Slika 11. Strukturna formula galne kiseline



Izvor: V. Čović, 2016.

Hidroksicimetne kiseline (C_6-C_3) i njihovi esterski derivati su neflavonoidi koji isto imaju zaštitnu ulogu i česti su sastojci voća i povrća. Najzastupljeniji predstavnici ovih tvari su cinaminska kiselina (slika 12.), p-kumarna kiselina, kavena i ferulična kiselina te njihovi esteri s vinskom i šikiminskom kiselinom.

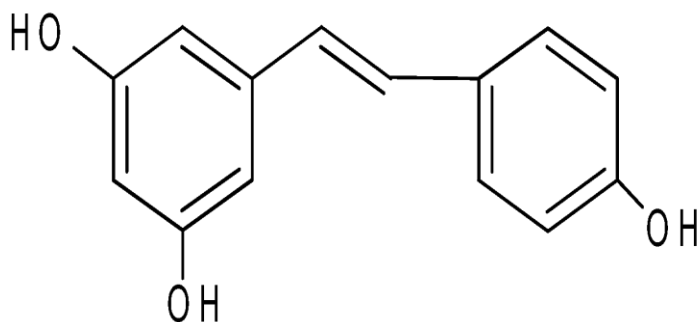
Slika 12. strukturna formula cinaminske kiseline



Izvor: V. Čović, 2016.

Stilben ($C_6-C_2-C_6$) su porodica neflavonoidnih polifenola kojima je uloga obrana biljaka od bakterijskih, virusnih i gljivičnih infekcija te zaštitna UV funkcija. Reserovatrol je najčešći predstavnik ove skupine spojeva koji ima izraženo antioksidativno djelovanje (slika 13.).

Slika 13. Strukturna formula reservatrola



Izvor: V. Čović, 2016.

Lignin je po rasprostranjenosti drugi organski spoj u prirodi iza celuloze. Ovaj polifenol ima iregularnu polimernu strukturu u kojoj osnovicu čine p-kumaril, koniferil i sinapil alkohol. Sastavni je dio stanične stijenke biljnih stanica a osim strukturne uloge služi i kao pasivna prepreka u ulasku patogena u biljno tkivo jer se vrlo teško razgrađuje

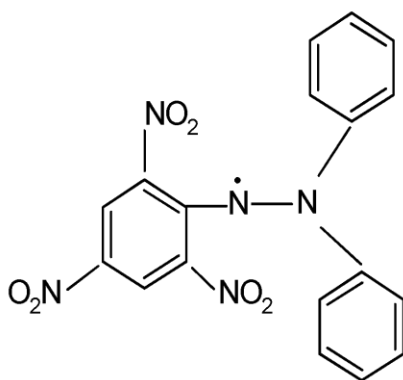
1.1.5. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva

Antioksidansi su hvatači reaktivnih tvari koji u tijelo ulaze hranom ili nastaju metaboličkim aktivnostima te štetnim djelovanjem zračenja i kemikalija. Antioksidansi neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala koji štete ljudskom zdravlju a između ostalog smanjuju rizik od srčanih bolesti i raka. Najznačajniji antioksidansi u ljudskom organizmu su vitamin C (askorbinska kiselina) i vitamin E (tokoferol). Slobodni radikali kao vrlo reaktivne čestice oksidiraju nukleinske kiseline, proteine ili lipide, dok polifenolne tvari u prvom redu flavanoidi i fenolne kiseline, imaju sposobnost inaktivacije i uklanjanja slobodnih radikala poput hidroksilnog ($\text{OH}\bullet$), hidroperoksilnog ($\text{HO}_2\bullet$) ili lipidno peroksilnih ($\text{LOO}\bullet$), (Vermerris i Nicholson, 2006) .

1.1.6. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Metoda DPPH je jedna od najkorištenijih metoda za određivanje antioksidacijske sposobnosti ekstrakta da reducira slobodni radikal. Temelji se na redukciji alkoholne otopine DPPH radikala (2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal) u prisutnosti antioksidansa pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H). DPPH radikal maksimalno apsorbira valnu duljinu od 517 nm, a što je veći stupanj njegove pretvorbe u neradikalni oblik to je manja vrijednost apsorbancije (Brkljačić, 2015).

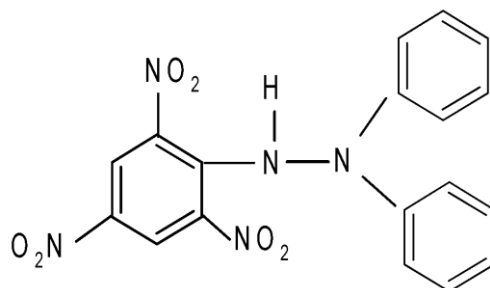
Slika 14. DPPH u formi slobodnog radikala



Izvor: V. Čović, 2016

Slika 14. prikazuje molekulu DPPH koja je stabilni slobodni radikal okarakteriziran delokalizacijom nesparenog elektrona koja kod ovog radikala uzrokuje ljubičastu boju njegove otopine. Reakcijom DPPH-a i antioksidativnih komponenata koje mogu dati vodikovi atomi dolazi do redukcije slobodnog radikala pri čemu se gubi ljubičasta boja (slika 15.)

slika 15. Neradikalski oblik DPPH



Izvor: V: Čović, 2016.

Redukcija DPPH u početnoj reakciji dovodi do smanjenja obojenosti otopine što se može izmjeriti i antioksidativni učinak tvari koja je reagirala s DPPH moguće je kvantizirati pomoću spektrofotometra.

1.1.7 Cilj istraživanja

U ovom radu cilj je bio provesti ekstrakciju cvijeta i lista smilja (*Helichrysum italicum* / Roth / G. Don) sakupljenog u prirodi korištenjem etanola i acetona kao otapala. U dobivenim ekstraktima utvrđena je antioksidacijska aktivnost korištenjem stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-pikrilhidrazil radikal (DPPH) spektrofotometrijskom metodom.

2. RAZRADA TEME

2.1. MATERIJALI I METODE

2.1.1. Materijali

Smilje za ovo istraživanje prikupljeno je na deset hrvatskih otoka i jednom poluotoku, ali za određivanje antioksidativne aktivnosti korišteni su uzroci samo sa nekih lokacija. Korišteno je smilje prikupljeno na Cresu, Braču poluotoku Pelješcu i Istri. Smilje je ubirano ručno, odnosno rezanjem vršnih zelenih dijelova pomoću srpa. Nakon što je ubrano stavljalo se u platnene vreće ili plahte. Nakon toga je stavljeno na „prirodno ” sušenje. Za „prirodno” sušenje su potrebne prostorije bez direktnog sunčevog zračenja te dobro ventilirane prostorije gdje je osigurana konstantna cirkulacija zraka. Suše se na mrežama u tankom sloju. Nakon što je smilje osušeno, pakirano je u kartonske kutije, te dopremljeno poštom. Cvjetovi su odvojeni u laboratoriju Veleučilišta u Rijeci na Poljoprivrednom odjelu u Poreču (M. Jakić, 2016.).

2.1.2. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Postupak određivanja:

Ekstrakcija fenolnih spojeva provedena je pomoću dvaju otapala: 30%-tna vodena otopina etanola ili 30%-tna vodena otopina acetona miješanjem na magnetnoj miješalici uz refluks pri temperaturi od 60°C te u trajanju od 30 min. Odvaje se $4 \pm g$ uzorka cvijeta ili $4 \pm g$ uzorka lista, zatim se doda 80 ml otapala za ekstrakciju(postepeno), te se ručno homogenizira u tarioniku s tučkom. Homogenizirani materijal prebačen je u Erlenmeyerovu tikvicu s ubrušenim čepom gdje je provedena ekstrakcija pomoću hladila s refluksom. Nakon provedene ekstrakcije sadržaj se profiltrirao sa filter papirom.

Uzorci ekstrakata su prebačeni u kivete i centrifugirani na 3000 RPM u trajanju od 15 minuta, kako bi se uklonio mogući talog. Nakon toga preneseni su u odmjernu tikvicu volumena 100 ml i nadopunjeni otapalom korištenim za ekstrakciju. Napravljeni su ekstrakti sa gore navedenih lokacija od lista i cvijeta u acetonu i alkoholu te su se koristili za određivanje antioksidativne aktivnosti. Na svakom uzorku provedena su tri određivanja, te su čuvani na tamnom i hladnom mjestu (4°C) do analize.

Aparatura i pribor:

1. Erlenmeyerove tikvice
2. menzure i odmjerne tikvice
3. analitička vaga (METTLER)
4. magnetna miješalica
5. pipete, volumena 5 ml, 10 ml, 20 ml
6. staklene čaše
7. filter papir

Reagensi:

1. 96%-tni etanol
2. 100%-tni aceton

2.1.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet ekstrakata smilja određen je korištenjem stabilnog slobodnog radikala DPPH. Dobivena aktivnost ekstrakata uspoređena je sa aktivnošću prirodnog antioksidansa vitamina C (askorbinska kiselina). Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog radikala DPPH•, koji radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidant, koji hvata slobodne radikale), ljubičast se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona.

Aparatura i pribor:

1. automatska pipeta 1000 ml
2. odmjerne tikvice, volumena 50 ml, 100 ml
3. analitička vaga (METTLER)
4. pipete 2ml, 5ml
5. lijevak
6. kivete
7. spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β).

Reagensi:

1. metanol
2. 0,5 mmol/L otopina 2,2- difenil- pikrilhidrazil, DPPH

Priprema: 0,02 g DPPH kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml, otopi sa metanolom i nadopuni do oznake

Postupak određivanja:

U epruvetu se otpipetira 1 ml fenolnog ekstrakta, 1 ml metanola, 0.5 ml 0,5 mmol/L otopine DPPH, dok se u drugu epruvetu otpipetira 1 ml metanola i 0.5ml 0,5 mmol/L otopine DPPH koja predstavlja kontrolni uzorak. Za slijepu probu uzima se otopina metanola. Epruvete se inkubiraju u mraku različito vrijeme, nakon čega se izmjeri apsorbancija pri 517 nm. Uzorci smilja inkubirani su 250 minuta a kod određivanja antioksidacijske aktivnosti vitamina C inkubacija je trajala 20 minuta. Na istom uzorku provedena su tri paralelna određivanja.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata smilja izražena je kao postotak redukcije DPPH prema formuli (Kulišić i sur., 2014.):

$$\% \text{ redukcije} = (A_k - A_u) / A_k \times 100$$

gdje je A_k apsorbancija kontrole a A_u je apsorbancija uzorka.

Izrada baždarnog pravca pomoću vitamina C:

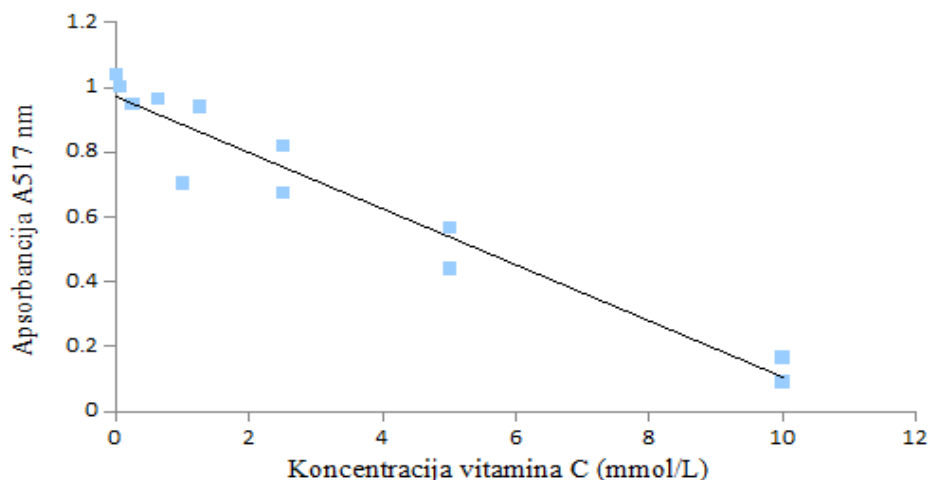
Antioksidacijsko djelovanje vitamina C kao modelne supstance korišteno je za izradu baždarnog pravca. U tu svrhu određen je odnos aktivnosti vitamina C na DPPH obzirom na njegovu koncentraciju. Dobivena jednačba baždarnog pravca bila je:

$$y = -0,09x + 0,97$$

$$R^2 = 0,94$$

gdje je: y - apsorbancija pri 517 nm
 x - koncentracija vitamina C (mmol/L)

Slika 16. Apsorbancija standarda vitamina C pri 517 nm



Izvor: Šunduković, 2018

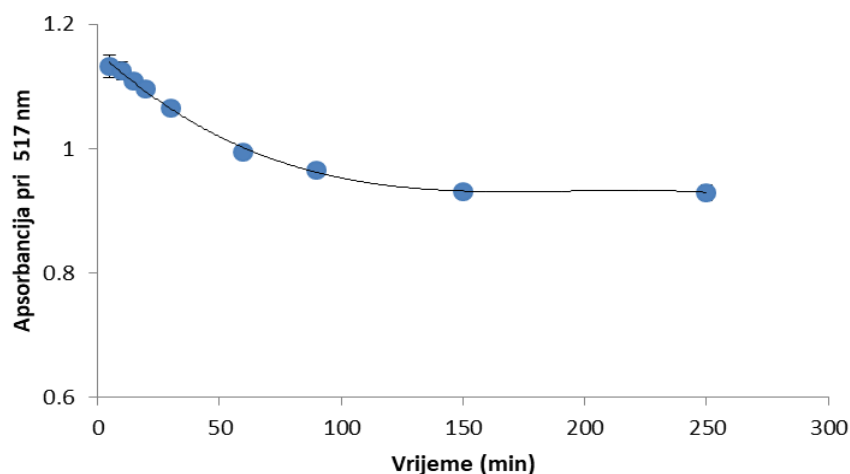
2.1.4. Statistička obrada podataka

Baždarni dijagrami izrađeni su u programu Excel (Microsoft, USA), a jednadžba pravca izračunata je korištenjem metode najmanjih kvadrata u istoimenom programu. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uzoraka prikazane su kao aritmetička sredina = standardna devijacija (SD). Usporedba aritmetičkih sredina dobivenih rezultata prikazana je u histogramima.

2.2. REZULTATI I RASPRAVA

Ekstrakcija fenolnih spojeva iz smilja (*Helichrysum italicum*) sa više lokacija provedeno je korištenjem etanola i acetona u trajanju od 30 minuta. Rezultati antioksidacijske aktivnosti ekstrakata ispitana je korištenjem stabilnog radikala DPPH. Praćenje redukcije DPPH pomoću ekstrakta smilja provedeno je u različitim vremenskim intervalima (Slika 17.) Utvrđeno je da se reakcija odvija sporo i da je završena nakon 250 minuta. Takva situacija je već opisana ako na DPPH djeluje složena otopina poput biljnog ekstrakta čije komponente različitim mehanizmima sudjeluju u redukciji (Kulisic i sur., 2004.). Kinetika reakcije može biti vrlo različita što je ustanovljenom promatranjem djelovanja i čistih modelnih spojeva na DPPH (Brand-Williams i sur., 1995.).

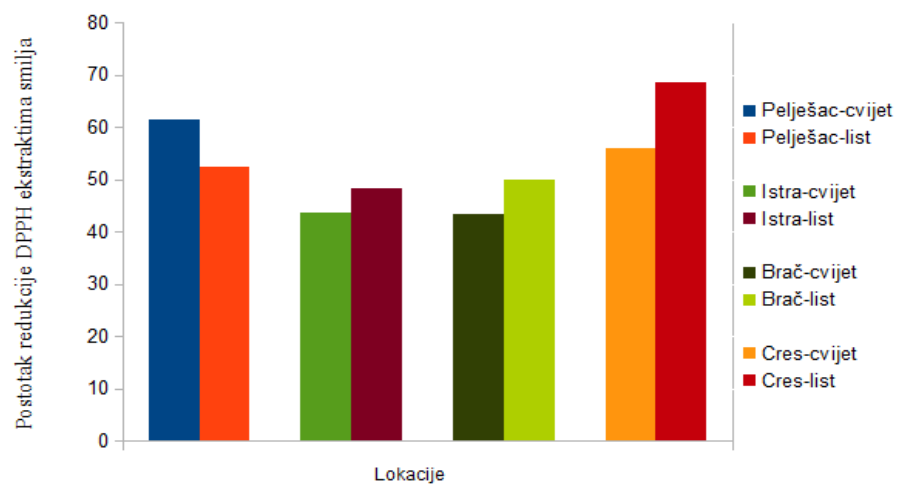
Slika 17. Odvijanje redukcije DPPH djelovanjem 30% alkoholnog ekstrakta cvijeta smilja s lokacije Pelješac. Vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu \pm SD.



Izvor: Šunduković, 2018.

Na slici 18. prikazana je antioksidacijska aktivnost 30% alkoholnih ekstrakata cvijeta i lista smilja s različitih lokacija. Na slici su prikazani rezultati antioksidativnog kapaciteta alkoholnih ekstrakata cvijeta i lista smilja sa lokacija: Pelješac, Istra, Brač i Cres. vidljivo je da je veća aktivnost u listu nego u cvijetu, osim lokacije Pelješac. Ističe se uzorak lista s Cresa koji ima najveću antioksidativnu aktivnost lista od svih drugih alkoholnih ekstrakata i uzorak Pelješca koji ima najveću aktivnost cvijeta.

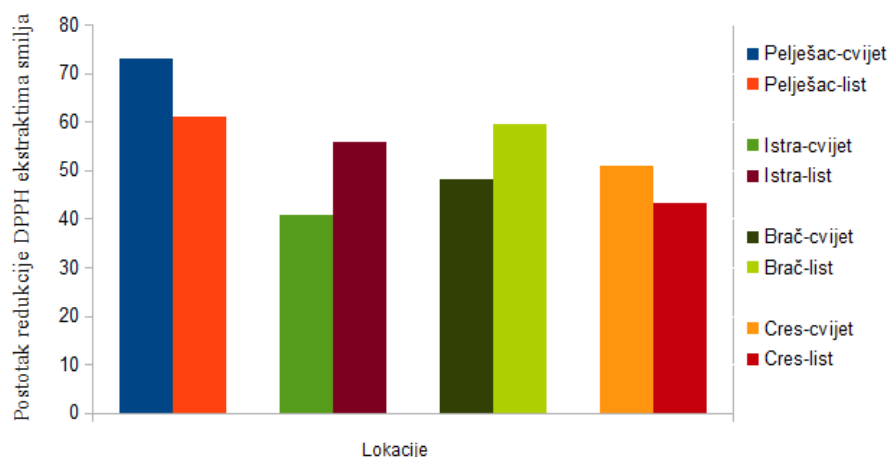
Slika 18. Antioksidacijska aktivnost alkoholnih ekstrakata lista i cvijeta smilja



izvor:Šunduković, 2018

Na slici 19. Prikazana je antioksidacijska aktivnost 30% acetonskih ekstrakata cvijeta i lista s ispitivanih lokacija. Kod acetonskih ekstrakata Pelješac cvijet se ističe kao uzorak sa najvećom aktivnošću, a kao najmanja aktivnost ističe se uzorak Istra cvijet.

Slika 19. Antioksidacijska aktivnost acetonskih ekstrakata cvijeta i lista smilja



izvor: Šunduković, 2018.

Najveća antioksidativna aktivnost kod acetonskih uzoraka je Pelješac-cvijet koji ujedno ima i najveću aktivnost od svih uzoraka alkoholnih i acetonskih. Kod uzorka Cres- list uočena je značajno smanjena aktivnosti koja je suprotna onoj kod alkoholnog ekstrakta Cres-list.

Alkoholni ekstrakti uzoraka sa ispitivanih lokacija pokazali su antioksidacijsku aktivnost koja odgovara antioksidacijskoj aktivnosti vitamina C u rasponu od 6.1 do 2.4 mmol/L. Najveću antioksidacijsku aktivnost (ekvivalent 2.4 mmol/L vitamina C) dao je uzorak cvijet smilja sa Brača, a najmanju aktivnost pokazao je uzorak lista smilja sa Cresa. (ekvivalent 6.1 mmol/L vitamina C)

Acetonski ekstrakti analiziranih uzoraka imali su antioksidacijsku aktivnost koja odgovara antioksidacijskoj aktivnosti vitamina C od 6.7 do 1.8 mmol/L. Najjači učinak pokazao je uzorak cvijet smilja iz Istre (ekvivalent 1.8 mmol/L vitamina C) dok je najmanji bio Pelješac cvijet (ekvivalent 6.7 mmol/L vitamina C).

Između alkoholog i acetonskog ekstrakta u većini slučajeva nije bilo značajnih odstupanja. Uočene razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između nekih alkoholnih i acetonskih ekstrakata kao u primjeru uzoraka sa Cresa mogu se prepisati različitim smjesama spojeva koji su dobiveni ovim ekstrakcijama. Naime, upotreba različitih otapala mogu se dobiti otopine čiji će sastav biti različit po količini i vrsti spojeva koji posjeduje antioksidacijsku aktivnost.

3. ZAKLJUČAK

- Možemo zaključiti da najveću aktivnost imaju alkoholni ekstrakti smilja sa Cresa.
- U slučaju acetonskih ekstrakata najveću aktivnost pokazali su uzorci smilja sa Pelješca.
- Kod alkoholnih ekstrakata uglavnom je ekstrakt lista pokazivao veću antioksidacijsku aktivnost.
- Korištenjem alkohola i acetona kao otapala dobivene su slične vrijednosti redukcije modelnog spoja DPPH.
- Ako se antioksidacijska aktivnost ekstrakata uspoređuje s aktivnosti vitamina C ona je također slična za oba korištena otapala.

POPIS LITERATURE

Knjige

1. Beljo. J, Barbarić. M, Čagalj. M, Duranović. A, Filipović. A, Ivanković. M, Kohnić. A, Mandić. A, Leko. M, Prlić. M, Rajić. M, Ostojić. I, Trkulja. V. Ekološka proizvodnja smilja i eteričnog ulja- dosadašnje spoznaje, Algoritam Zagreb, 2016.
2. FSI Grupa d.o.o., Paulovnja i Smilje. Tiskara Zelina, 2016.
3. Schaffner. W, Häfelfinger. B, Ernst. B Ljekovito bilje kompendij, Leo-commerce Rijeka, 1999.

Časopisi

4. Rajić. M, Bilić. M, Aladić. K, Šimunović. D, Pavlović. T, Jakić S. Od tradicionalne uporabe do znanstvenog značaja: Cvijet smilja, Glasnik zaštite bilja, 2015. 16-26

Ostalo

5. Brand-Williams.W, Cuvelier. M.E., Berset.C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, Departement Science de l' Aliment, France, 1994.
6. Brkljačić. M. Utjecaj pH vrijednosti podloge na sadržaj fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost smilja u uvjetima in vitro. Sveučilište u Zagrebu, Prirodno – matematički fakultet, 2015
7. Čović. V. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz nevena, Veleučilište u Rijeci, 2016.
8. Dudaš. S. interna skripta Aromatično i ljekovito bilje, Veleučilište u Rijeci, 2017.
9. Jakić. M. Ispitivanje sadržaja eteričnog ulja samoniklog smilja podrijetlom sa jedanaest otoka hrvatskog primorja, Veleučilište u Rijeci, 2016.
10. Kulišić. T, Radonić. A, Katalinić. V, Miloš. M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, Faculty of Chemical Tehnology, University of Split, 2003.
11. Lovrić S. Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, 2014.

12. Mucalo. Z, Smilje (*H. italicum*) od tradicionalne uporabe do znanstvenih istraživanja, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
13. Pohajda I, Dragun. G, Visković. L.P, Smilje, Savjetodavna služba, siječanj 2015 Zagreb.
14. Vermeris. W., Nicholson. R., Phenolic compound biochemistry, Springer, The Netherlands, 2006.

Web stranice:

15. <http://www.gospodarski.hr/>
16. <https://nutricionizam.com/flavonoidi/>
17. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/ljekovito-bilje/smilje-370/>
18. <http://hirc.botanic.hr/fcd/Galerija/>

POPIS SLIKA

1. Slika 1. Samoniklo primorsko smilje (<i>Helichrysum italicum</i>) na stijenama.....	1
2. Slika 2. Primorsko smilje (H. <i>Italicum</i>).....	2
3. Slika 3. List smilja (H. <i>Italicum</i>).....	4
4. Slika 4. Sjeme smilja.....	5
5. Slika 5. Klijanci smilja.....	6
6. Slika 6. Proizvodnja presadnica vegetativnim razmnožavanjem.....	7
7. Slika 7. Ručna berba smilja.....	8
8. Slika 8. Kultivirani nasad smilja.....	9
9. Slika 9. Strukturna formula fenola.....	13
10. Slika 10. Strukturna formula flavonoida.....	14
11. Slika 11. Strukturna formula galne kiseline.....	15
12. Slika 12. Strukturna formula cinaminske kiseline.....	16
13. Slika 13. Strukturna formula reserwatrola.....	17
14. Slika 14. DPPH u formi slobodnog radikala.....	18
15. Slika 15. Neradikalni oblik DPPH.....	19
16. Slika 16. Apsorbancija standarda vitamina C pri 517 nm.....	23
17. Slika 17. Odvijanje redukcije DPPH djelovanjem 30% alkoholnog ekstrakta cvijeta smilja s lokacije Pelješac.....	24
18. Slika 18. Antioksidacijska aktivnost alkoholnih ekstrakata cvijeta i lista smilja.....	25
19. Slika 19. Antioksidacijska aktivnost acetonskih ekstrakata cvijeta i lista smilja.....	26

POPIS TABLICA

Tablica 1. Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju smilja, (Rajić i sur.,2015).....	11
---	----